

CONGEN

**SureFood® ANIMAL
QUANT Курица**

Артикул №S1014
2 x 50 гxn

Руководство пользователя



ноябрь 2019

Пожалуйста, обращайтесь по вопросам технической поддержки и дополнительной информации к официальным дистрибьюторам на территории Вашей страны:

**Официальный дистрибьютор
в России:**

ООО "НеоТест"

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир
+7 499 649 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

Техническая поддержка

support@neo-test.ru

+7 499 704 05 50



**Официальный дистрибьютор
в Беларуси:**

ОДО "КомПродСервис"

ул. Филимонова, 25Г, г. Минск
+375 17 336 50 54

info@komprod.com

www.komprod.com

Техническая поддержка

support@komprod.com

+375 17 336 50 54



1 Общая информация

1.1 Описание

SureFood® ANIMAL QUANT Chicken – набор для проведения ПЦР в реальном времени для определения соотношения ДНК курицы (*Gallus galus*) к общему содержанию ДНК животных в образцах мяса. Таким образом, набор содержит две системы ПЦР, одну для обнаружения специфического гена курицы (ген обнаружения) и одну для обнаружения гена животного (референс, контрольный ген).

Анализ ПЦР в реальном времени можно использовать с известными приборами ПЦР в реальном времени. Техническая проверка набора была проведена на Agilent Mx3005P, Applied Biosystems 7500, Roche LightCycler® 480 II, Qiagen Rotor-Gene Q.

1.2 Предел обнаружения и предел количественной оценки

Предел обнаружения <5 копий ДНК. Предел обнаружения анализа зависит от матрицы, степени обработки, подготовки ДНК и содержания ДНК.

Предел количественного определения зависит от концентрации ДНК. Например, если присутствуют 50000 копий целевой последовательности эталонного гена, относительный предел количественного определения для ДНК курицы составляет 0,1%.

Системы ПЦР SureFood® очень чувствительны, поэтому даже небольшого количества целевой ДНК достаточно для успешного анализа. Концентрация общей ДНК в образце не позволяет сделать вывод о количестве и качестве целевой ДНК.

1.3 Экстракция ДНК

Для подготовки проб рекомендуется использовать SureFood® PREP Basic (арт. № S1052), для продуктов питания и кормов с высокой степенью переработки рекомендуется использовать SureFood® PREP Advanced.

1.5 Состав набора

Код реагента	Реагент	Количество	Цвет крышки
1	Референс реакционная смесь	2 x 500 мкл	Оранжевый
2	“Chicken” реакционная смесь	2 x 500 мкл	Желтый
3	Тaq Полимераза	1 x 11 мкл	Красный
4	Буфер для разведения	1 x 1300 мкл	Белый
5	Стандартная ДНК	1 x 45 мкл	Темно-голубой
6	Положительный контроль (100% Chicken)	1 x 80 мкл	Светло-голубой

Храните реагенты при -20°C и защищайте от света.

Необходимое оборудование и материалы:

- набор для экстракции ДНК (например, SureFood® PREP Basic, артикул S1052; SureFood® PREP Advanced);
- прибор для ПЦР в реальном времени;
- расходные материалы для ПЦР в реальном времени (планшеты, пробирки, капилляры, фольга, крышки), пипетки с наконечниками с фильтрами;
- одноразовые перчатки без порошка;
- вихревой смеситель;
- микроцентрифуга с ротором для реакционных пробирок.

1.6 Установочные параметры термоциклера

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
Начальная денатурация (HOLD) Циклы Денатурация Отжиг/Элонгация (CYCLE)	5 мин, 95°C, 45 15 с, 95°C 30 с, 60°C	1 мин, 95°C 45 10 с, 95°C 15 с, 60°C
Скорость температурного перехода/ Ramp Rate	Максимум	Максимум

1.8 Настройка канала обнаружения

Прибор	Определение	Детектирующий канал	Тушитель	Примечания
Agilent Mx3005P	Chicken	FAM	+	
	Reference	FAM	+	
Agilent AriaDx	Chicken	FAM	+	
	Reference	FAM	+	
Applied Biosystems 7500	Chicken	FAM	Нет	пассивный эталонный краситель ROX с настройкой «нет».
	Reference	FAM	Нет	
Bio-Rad CFX96	Chicken	FAM	+	
	Reference	FAM	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	Chicken	green	+	
	Reference	green	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	Chicken	green	+	
	Reference	green	+	
Roche LightCycler® 480 II	Chicken	465-510	+	
	Reference	465-510	+	
Roche cobas® z 480	Chicken	465-510	+	

Analyzer	Reference	465-510	+	
----------	-----------	---------	---	--

2 Качественный анализ

2.1 Протокол

2.1.1 Приготовление мастер-микса

Реакции, необходимые для референс обнаружения:

5 реакций для стандартной кривой.

3 реакции для контроля (1x контроль без матрицы, 2x положительный контроль)

Для каждого образца: минимум 1 реакция на каждый образец ДНК.

Реакции, необходимые для обнаружения целевой ДНК:

5 реакций для стандартной кривой.

3 реакции для контроля (1x контроль без матрицы, 2x положительный контроль).

Для каждого образца: минимум 1 реакция на каждый образец ДНК.

Также рекомендуется приготовить мастер-микс с 10% избытком объема, чтобы компенсировать потерю реагента. Дайте реагентам оттаять, перемешайте встряхиванием и центрифугированием перед открытием и использованием.

Пробирку с Taq-полимеразой следует хранить при -20 °C и не перемешивать встряхиванием.

Пример расчета и подготовки 10 реакций:

Компоненты для мастер-микса	Объем на 1 реакцию	10 реакций (с 10% избытком)
Реакционная смесь	19.9 мкл	218.9 мкл
Taq Полимераза	0.1 мкл	1.1 мкл
Общий объем	20 мкл	220 мкл

Хорошо перемешайте мастер-микс и центрифугируйте до использования.

2.1.2 Приготовление стандарта ДНК

Разведите стандартную ДНК (код 5) с шагом 1:10 в буфере для разведения (код 4), чтобы подготовить различные концентрации ДНК для стандартной кривой эталонного гена (эталон) и детектирующего гена (Chicken). Приготовьте 5 разведений поставляемой стандартной ДНК (код 5) с помощью прилагаемого буфера для разведения (код 4). Подготовьте 5 реакционных пробирок (помеченных от S1 до S5) и добавьте в каждую по 45 мкл буфера для разведения (код 4).

Рекомендуется следующая процедура:

Стандарт	Разведение	Количество копий в мкл	Конечное количество копий в реакции
S1	45 мкл Буфер для разведения + 5 мкл ДНК стандарта	100000	500000
S2	45 мкл Буфер для разведения + 5 мкл ДНК S1	10000	50000
S3	45 мкл Буфер для разведения + 5 мкл ДНК S2	1000	5000
S4	45 мкл Буфер для разведения + 5 мкл ДНК S3	100	500
S5	45 мкл Буфер для разведения + 5 мкл ДНК S4	10	50

Примечание: для каждой калибровочной точки используют 5 мкл стандартной ДНК. Окончательное количество копий на реакцию должно быть введено в программное обеспечение для анализа системы обнаружения ПЦР в реальном времени.

2.1.3 Приготовление мастер-микса

- Внесите пипеткой 20 мкл мастер-микса в соответствующие пробирки / лунки или капилляры.
- Закройте пробирку с отрицательным контролем (отрицательный контроль готов к ПЦР без добавления).
- Внесите пипеткой 5 мкл образца ДНК в указанные пробирки / лунки или капилляры и закройте их.
- Внесите пипеткой 5 мкл положительного контроля и стандартных разведений в указанные пробирки / лунки или капилляры и закройте их.
- Центрифугируйте все пробирки / планшеты или капилляры на низкой скорости.
- Поместите пробирки / планшеты или капилляры в прибор для ПЦР и запустите реакцию в соответствии с настройками.

2.2 Интерпретация результатов

Расчет для обеих реакционных систем (референс, Chicken) должен выполняться отдельно. Отметьте стандарты, контроли и образцы для специфической цели (Chicken) и проведите оценку в соответствии с программой анализа, рекомендованной производителем прибора для ПЦР. Повторите ту же процедуру для эталонной генной системы (референс). Значение наклона стандартной кривой должно быть от -3,1 до -3,6, а коэффициент корреляции $R^2 > 0,98$. В случае других значений для стандартной кривой ее не следует использовать для расчета.

Используя рассчитанное количество копий для референс-образца и Chicken, относительное содержание Chicken в образце ДНК и положительном контроле можно определить следующим образом (пример):

Образец Chicken – 1350 копий, Положительный контроль Chicken – 900 копий.
Образец Референс – 45000 копий, Положительный контроль Референс – 1100 копий.
Разделите количество копий конкретной системы на количество копий гена референсной системы и умножьте на 100, чтобы получить процент.

Содержание ДНК Chicken = $\text{Chicken количество копий} * 100 / \text{Количество копий Референс} = 1350 * 100 / 45,000 = 3 \%$

Для данного примера содержание Chicken ДНК в образце 3,0% и 81,8% для положительного контроля.

Для окончательного расчета необходимо использовать поправочный коэффициент К для коррекции колебаний от запуска к запуску. Поправочный коэффициент представляет собой соотношение между истинным процентным значением положительного контроля (100% содержания Chicken ДНК) и измеренным процентным содержанием ДНК в положительном контроле. Коэффициент рассчитывается следующим образом:

$K = \text{истинный процент} / \text{измеренный процент}$

$K (\text{пример}) = 100\% / 81,8\% = 1,2$

Расчетное значение для выборки умножается на К, чтобы получить скорректированное значение.

$\text{Процент ДНК в образце} = \text{измеренный процент ДНК в образце} * K = 3,0 * 1,2\% = 3,6\%$

Таким образом, содержание ДНК Chicken составляет 3,6%.

Примечание: внутренние органы, особенно почки или печень, показывают более высокое содержание ДНК на единицу веса по сравнению с мышечной тканью. Это может привести к неправильной оценке видового состава продукта. Для мясных продуктов с содержанием внутренностей > 5% необходимо соблюдать осторожность при оценке видового состава продукта.

Файл Excel для расчета и информацию о настройке приборов для проведения ПЦР анализа в реальном времени можно загрузить на: www.congen.de/en/company/downloads или запросить у официально дистрибьютора.